

한국 야생 등줄쥐의 고해상도 염색체분형상

오승현 · 윤여성¹ · 진희경² · 성제경*

서울대학교 수의과대학 발생·유전학교실

¹서울대학교 수의과대학 조직학교실

²경북대학교 수의과대학 실험동물학실

(게재승인: 2004년 2월 10일)

Chromosomal band pattern of black-striped field mouse (*Apodemus agrarius*)

Seung-hyun Oh, Yeo-sung Yoon¹, Hee-Kyung Jin², and Je-kyung Seong*

Laboratory of Departmental Biology and Genomics, College of Veterinary Medicine, Seoul National University,
Seoul 151-742, Korea

¹Laboratory of Histology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

²Laboratory of Laboratory Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University,
Daegu 702-701, Korea

(Accepted: February 10, 2004)

Abstract : We investigated the cytogenetic characteristics of male black-striped field mouse (*Apodemus agrarius*) in Korea. Chromosome slides were obtained from blood cell cultures which were synchronized with thymidine blocking or not. In the chromosome slide which synchronization with thymidine blocking was employed on, the GTG(G bands by trypsin using Giemsa)-bands of high resolution were observed. The male black-striped field mouse has 48 chromosomes composed 46 autosomes and XY sex chromosomes. The centromeric regions of autosomes were positive to GTG-banding. According to this investigation, thymidine blocking in cell culture process was useful to get lengthened chromosomes. It may be necessary to employ RBG-banding technique to investigate complementary band patterns between R- and G-banding in black-striped field mouse.

Key words : black-striped field mouse, karyotype, GTG-bands

서 론

등줄쥐(*Apodemus agrarius*)는 분류학적으로 포유강(Class Mammalia), 설치목(Order Rodentia), 붉은쥐과(Family Apodemus)에 속하는 야생동물로 동부아시아와 우리나라 전역에 분포하는 것으로 알려져 있다. 외형적으로 배쪽은 회색을 띤 흰색이며, 등쪽은 붉은 빛을 띤 갈색에 이마부터 꼬리까지 검은 줄무늬가 있어 등줄쥐(striped-field mouse)라고 불린다. 등줄쥐의 크기는 마우스와 비슷하지만 랫드와 같이 담낭이 없으며 위장의 유

암종(gastric carcinoid) 자연발생율이 높다고 알려져 있다 [12].

야생 등줄쥐는 사람에게서 유행성 출혈열을 일으키는 한탄바이러스의 자연숙주로서 최초로 보고 되었으며 [10], 조 등 [5]은 야생 등줄쥐를 대상으로 한탄바이러스, 리켓치아, 렘토스피라균 등의 감염경로, 전파방법, 발병기전 등을 보고하였다. 이러한 야생등줄쥐의 생물학적 위험성에도 불구하고 고유 동식물 자원화의 일환으로 최근에는 한국산 야생등줄쥐의 제특성을 규명하여 새로운 실험동물로서의 가능성을 보고한 바가 있다 [2, 4, 5]. 현

본 과제는 한국과학재단 핵심전문연구과제의 지원으로 수행되었음(931-0800-009-2)

*Corresponding author: Je-kyung Seong

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
[Tel: +82-2-880-1259, Fax: +82-2-837-8395, E-mail: snmouse@snu.ac.kr]

제 등줄쥐는 실험동물자원으로서, 랫드를 대신하여 기생충 감염실험과 신증후출혈열 관련연구에 유용한 모델로 사용되고 있다 [6]. 그러나 아직까지 야생등줄쥐 실험동물화를 위한 해부, 생리학 및 유전적 특성에 관한 연구가 체계화되지 못한 실정이다. 특히 국내에 서식하는 등줄쥐의 세포유전학적 연구로서, 핵형 또는 각 염색체의 분염상의 연구는 동물종에 대한 특이성을 갖기 때문에 생물종간의 유연관계 확인을 위한 계통분석 및 유전적인 특징을 찾는 기초연구로 이루어져 왔다. Koh [8], 김 등 [1]이 등줄쥐에 대한 염색체 분석에서 염색체 수, 형태와 분염상을 밝힌 바 있으나 등줄쥐의 세포유전학적 특성을 파악하기 위하여 고해상도 분염법을 이용한 연구가 필요한 실정이다.

이에 본 연구에서는 등줄쥐에 대한 세포유전학적 특징을 규명하기 위하여 비장으로부터 분리한 림프구를 배양하여 염색체 표본을 제작한 후 고해상도 G-분염법을 확립하였고, 본 연구에서 얻은 결과를 토대로 등줄쥐를 실험동물로 활용하기 위한 기본 자료를 제시하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물

강원도 속초시 수산리 일대에서 포획한 수컷 등줄쥐 (*Apodemus agrarius*) 3수를 연구에 사용하였다.

염색체 표본제작

(1) 세포배양

실험동물을 경추탈골로 희생시킨 후 비장을 적출하였다. 적출한 비장을 두장의 슬라이드글라스 사이에 넣어 원심력으로 마찰을 일으켜 비장세포를 추출하였다. 추출물을 RPMI 1640 (Gibco Co.) 액체배지에 넣고 원심분리하여 백혈구층을 분리한 다음 fetal calf serum (Gibco Co., 15%), concanavalin (Sigma Co., 3 µg/ml), lipopolysaccharide (Sigma Co., 10 µg/ml)가 첨가된 RPMI 1640 (Gibco Co.) 액체배지를 넣은 배양플라스크에 옮겼다. 배양액을 잘 혼합한 후 혈구계산판을 이용하여 유핵세포수가 ml 당 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 의 세포 밀도가 되도록 배양액을 첨가하였다. 세포배양액을 넣은 플라스크에 colcemid (Sigma Co., 0.02 µg/ml)를 첨가하고 30분 경과 후에는 1,500 rpm (UNION 32R Plus, 한일과학, 한국)에서 7분간 원심분리하였다(A 세포배양). 세포배양액을 넣은 다른 플라스크를 37°C CO₂ 배양기에 넣은 다음 46시간 경과한 후 thymidine (Sigma Co., 300 µg/ml)를 첨가하고 8시간이 경과된 후 배양액을 원심분리관에 넣고 1,200 rpm (UNION 32R Plus, 한일과학, 한국)에서

5분간 원심분리하여 상층액은 버리고 배양액을 첨가하였다. 이 과정을 2회 반복한 다음 3시간 30분간 배양한 후 colcemid (Sigma Co., 0.02 µg/ml)를 첨가하였다. 30분 경과 후에는 1,500 rpm (UNION 32R Plus, 한일과학, 한국)에서 7분간 원심분리하였다(B 세포배양).

(2) 표본제작

A, B 세포배양액을 원심분리하여 상층액을 제거한 후 0.56% KCl 2.5 ml를 첨가하고 20분간 방치한 다음 고정액으로 Carnoy 용액 (메탄올:초산=3:1)을 천천히 첨가하였다. 1,500 rpm (UNION 32R Plus, 한일과학, 한국)에서 3분간 원심분리한 후 상층액은 버리고 고정액을 다시 첨가하여 1,500 rpm (UNION 32R Plus, 한일과학, 한국)에서 3분간 원심분리하였다. 이 과정을 2회 반복하였다. 상층액을 버린 후 새로 만든 고정액을 2 ml 정도 가한 다음 100% 에탄올 (Merck Co.)로 세척한 슬라이드 글라스 위에 처리용액을 피펫으로 점적하여 슬라이드 건조기에서 24시간 이상 건조시켰다.

GTG(G bands by trypsin using Giemsa) 분염법

염색체 표본 슬라이드를 60°C 배양기 안에서 24시간 동안 충분히 건조시킨 뒤 분염에 사용하였다. 표본 슬라이드를 0.025% trypsin 용액 (Gibco Co.)에서 2분간 반응한 다음, PBS (pH 7.0)로 5초간 수세하고, Sorenson's buffer (pH 6.8)에 5%로 희석한 Giemsa (Sigma Co.)용액으로 8분간 염색하였다. 염색한 후 흐르는 물에 1분간 수세하여 자연 건조시킨 다음 현미경으로 관찰하였다.

사진촬영

GTG-분염법을 수행한 염색체 표본을 광학현미경으로 관찰한 다음 Kodak technical pan 필름 (ASA 25, B/W)을 사용하여 1,000배로 촬영하였다.

결 과

수컷 등줄쥐의 염색체 표본에 대한 GTG-분염 결과 세포분열 중기의 각 세포들에서 23쌍의 상동염색체와 XY 성염색체로 이루어진 48개의 염색체가 관찰되었다 (Figs. 1, 2). 염색체 표본의 건조정도, trypsin의 농도 및 반응시간 Giemsa 용액 반응시간에 따라서 분염상이 달랐으나 염색체가 길수록 뚜렷한 분염상을 보였다. 본 세포배양과정에서 thymidine을 첨가하였을 경우, 상대적으로 thymidine을 첨가하지 않았을 경우보다 세포분열 중기과정에 있는 세포들이 많았으며 염색체의 길이 또한 신장되었다(Figs. 1, 2). 대부분 염색체의 중심체주변이 GTG-분염에 염색되었다.

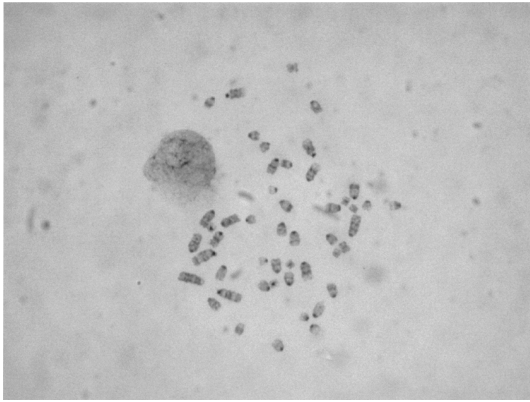


Fig. 1. GTG-banded metaphases of a male black-striped field mouse. Chromosome slides were obtained from blood cell cultures which were not synchronized with thymidine blocking.

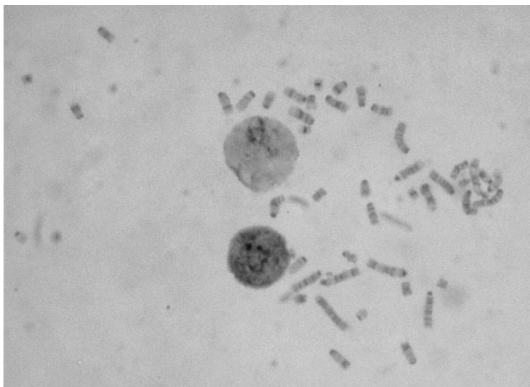


Fig. 2. GTG-banded metaphases of a male black-striped field mouse. Chromosome slides were obtained from blood cell cultures which were synchronized with thymidine blocking.

고찰

염색체는 세포분열과정에 나타나는 DNA를 포함하는 구조물로써 하나의 세포에서 나타나는 염색체의 수와 모양은 동물의 종류에 따라 특이성을 갖는다. 각 염색체의 분염상 또한 종에 대한 특이성을 갖기 때문에 생물 종간의 유연관계 확인을 위한 계통분류 및 유전적인 특징을 찾는 세포유전학적 기초연구로 이루어져 왔다 [14]. 우리나라 고유의 축종인 한국재산양(*Capra hircus*)의 세포유전학적 특징 규명을 통한 생물학적 가치를 밝히기 위하여 분염상이 보고된 바 있다. 또한 소과 동물의 일종으로서 멸종 위기에 처한 산양(*Naemorhedus goral*)

에 대한 G-분염 결과, 형태학적 특징에 근거한 과거의 계통분류에 있어서 세포유전학적 연구에 의한 보완이 필요하다고 보고되었다 [3, 11].

일반적으로 핵형분석을 위해서는 GTG-분염법이 가장 보편적으로 이용되어 왔는데 GTG-분염법의 원리는 구조단백질이 Giemsa 용액에 반응한다는 주장이 있고 arginine이 풍부한 histone 단백질 부분이 염색된다는 주장이 있으나 아직까지 확실하게 밝혀지지는 않았다. GTG-분염법에 의해서 어둡게 염색되는 부분은 DNA 사슬에서 guanosine-cytidine 염기쌍보다 adenosine-thymidine 염기쌍이 훨씬 많이 존재하는 부위인 것으로 알려져 있다 [7, 13].

정확한 핵형분석과 분염을 위해서는 세포분열과정을 동기화하여 많은 중기 세포들을 확보할 수 있어야 한다. 또한 세포질의 팽창이 충분하지 않을 경우 염색체가 서로 겹치게 되어 분염상의 확인이 어려우며 팽창이 과도할 경우 사진촬영을 위한 1,000배의 현미경 시야에 모든 염색체가 포함되지 않아 핵형분석이 어렵다.

본 실험에서 사용된 등줄쥐의 염색체에서 GTG-분염상은 Koh [8]와 김 등 [1]이 보고한 등줄쥐의 염색체 분염상보다 해상도가 훨씬 높았다. 본 실험에서는 배양중인 림프구에서 많은 수의 중기염색체를 얻기 위해서 thymidine를 첨가하여 G1/S 과정을 차단하였다. 이러한 thymidine block은 feed back mechanism으로 배양액 내의 cytidine이 deoxycytidine triphosphate로 전환되는 것을 억제하여 세포의 분열과정중 S기에서 많은 세포들이 정체되어 있도록 하였다 [11]. 또한 세포질의 적절한 팽창을 위하여 0.56% KCl 저장액의 반응시간 및 반응온도를 조절하였다.

본 실험에서 등줄쥐 염색체 분염상의 해상도가 향상되었지만 19번 이후 20부터 23번 염색체까지의 핵형을 분석을 하기에는 여전히 어려움이 있었다. Koh [8]는 등줄쥐에서 4쌍의 metacentric 염색체가 관찰되며 김 등 [1]은 등줄쥐에서 2쌍의 metacentric, 1쌍의 submetacentric 염색체를 보고한 바 있다. 그러나 여전히 등줄쥐의 염색체 모양에 대해서는 확실하게 밝혀지지 않았다.

정확한 핵형분석을 위해서는 G-분염상의 반대상을 확인할 수 있는 R-분염법을 함께 수행하기도 한다. R-분염법중에서도 RBG(R-bands BrdU using Giemsa)는 DNA 합성기의 late replicating region에 BrdU가 thymidine을 대신하여 DNA 사슬에 삽입되도록 하여 Fluorescence Plus Giemsa method로 분염을 수행하는 것으로 높은 해상도의 분염상을 확인할 수 있다고 알려져 있다 [9, 13]. 그러나 이 방법은 사용될 동물의 세포분열 주기를 명확히 알고 있어야만 thymidine과 BrdU의 투여시기를 정확히 알 수 있다.

따라서 보다 정확한 등줄쥐의 핵형분석을 위해서는 세포분열주기를 파악하여 prometaphase의 염색체 표본을 확보하는 것이 가장 시급하다고 생각된다. 또한 복제분염법인 GBG-와 RBG-분염법을 이용하여 상보적인 분염상을 확인하고 고해상도의 염색체표본을 대상으로 한 CBG-분염법으로 정확한 중심체 부위를 확인하여 염색체의 모양을 확인하는 것이 필요하다고 생각된다.

참고문헌

1. 김윤희, 김희수, 최영현, 이원호. 한국산 등줄쥐의 체세포 및 생식세포 분열에 의한 염색체 분석. 한국실험동물학회지. 2001, **17**, 17-26.
2. 김재연, 조정식, 채갑용. 한국에 서식하는 야생등줄쥐의 실험동물화에 관한 연구(I). 과학기술처, 1991.
3. 오승현, 윤영민, 윤여성, 이준섭, 이홍식, 성제경. 한국개래산양의 핵형분석. 대한수의학회지. 1999, **39**, 908-920.
4. 조정식, 채갑용, 김지희. 한국에서 서식하는 야생등줄쥐의 실험동물화에 관한 연구(II). 과학기술처, 1992.
5. 조정식, 채갑용, 김지희. 한국에서 서식하는 야생등줄쥐(*Apodemus agrarius Pallas*)의 실험동물화에 관한 연구(III). 과학기술처, 1993.
6. 土屋公幸. 新しく實驗動物として開發された野生齧齒類の維持方法の開發. 九州實驗動物研究會會報. 1991, **7**, 3-9.
7. Di, Bernardino, D., Ronne, M., Burguete, I., Lioi, M. B., Taibi, L. and Matassino, D. R-banding pattern of the prometaphase chromosomes of the goat. *Heredity*. 1987, **78**, 225-230.
8. Koh, H. S. G- and C- banding pattern analysis of Korean rodents. *Korean J. Zool.* 1982, **25**, 81-92.
9. Latt, S. A. Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1973, **70**, 3395-3399.
10. Lee, H. W., Lee, P. W. and Johnson, K. M. Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.* 1978, **137**, 298-308.
11. Lemieux, N., Drouin, R. and Richer, C. L. High-resolution dynamic and morphological G-bandings (GBG and GTG): a comparative study. *Hum. Genet.* 1990, **85**, 261-266.
12. Oh, S. W., Chae, C. and Jang, D. Spontaneous gastric carcinoid tumors in the striped field mouse (*Apodemus agrarius*). *J. Vet. Med. Sci.* 1997, **59**, 703-706.
13. Perry, P. and Wolff, S. New Giemsa method for differential staining of sister chromatids. *Nature*. 1974, **261**, 156-158.
14. Takagi, N. A simple technique to demonstrate the centromeric 'heterochromatin' in the mouse and other animals. *Jpn. J. Genetics.* 1971, **46**, 361-363.